

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10593

研究課題名(和文) 腎がんに対するイミキモドとチロシンキナーゼ阻害剤の新規併用療法

研究課題名(英文) Novel combination therapy with imiquimod and tyrosine kinase inhibitor against renal cell carcinoma

研究代表者

辛島 尚 (KARASHIMA, Takashi)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授

研究者番号：60304672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、腎がんに対して、Toll-like receptor 7を介した免疫賦活剤であるイミキモド経皮投与とチロシンキナーゼ阻害剤の経口投与による併用療法を実臨床に応用できる新規治療方法として確立することである。本併用療法は、腫瘍特異的細胞障害性T細胞を活性化し、腫瘍内に誘導することで、相乗的な抗腫瘍効果を示した。イミキモドとの併用療法に、より適したチロシンキナーゼ阻害剤はソラフェニブであった。その用量は比較的低用量で効果を示した。また、動物モデルにおいてその安全性が証明された。

研究成果の概要(英文)：The specific aim of the study is to demonstrate a novel therapeutic strategy that can be applied clinically to a combination therapy with transdermal administration of Imiquimod as an immunoagent via Toll-like receptor 7 and oral administration of a tyrosine kinase inhibitor to in renal cell carcinoma. The combination therapy showed a synergistic antitumor effect by activating tumor-specific cytotoxic T cells and inducing it in to the tumor. An appropriate tyrosine kinase inhibitor for combination therapy with imiquimod was sorafenib. Relatively low dose sorafenib was effective. In addition, the combination therapy was safety in animal models.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎癌 免疫療法 チロシンキナーゼ阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)は分子標的薬の一つであり、がん治療に広く導入されている。分子標的薬のメカニズムには主に、シグナル伝達阻害、血管新生阻害、細胞周期の調節があり、TKIの一つであるソラフェニブはシグナル伝達阻害と血管新生をターゲットとする。ソラフェニブは外科手術不能な転移性腎がんの全身療法として用いられており、Rafを阻害することでがん細胞の増殖を抑制し、VEGF受容体を阻害することで腫瘍の血管新生を抑制する。

イミダゾキノリン誘導体の一つであるイミキモドはクリーム剤として日光角化症や尖圭コンジローマにたいする治療に用いられている。その作用機序は、形質細胞様樹状細胞に発現する Toll-like receptor (TLR7)へ結合することでアゴニスト活性を示し、IFN- $\alpha$ の産生促進や細胞性免疫応答を賦活化することでウイルス感染細胞を傷害する。我々は、ソラフェニブ投与中の腎がん患者に発生した、がん性胸水と皮膚転移においてイミキモド塗布が有効であった症例を経験した。このことと、TKI治療は薬剤耐性や副作用、高額な薬価等の問題により限界に達していることを踏まえ、より低用量のTKI経口投与とイミキモドクリーム経皮投与の併用療法に着目した。

これまで、マウス腎がん細胞 RENCA を BALB/c マウスの皮下に移植し、イミキモド+ソラフェニブ併用療法を 28 日間連日行い、腫瘍体積を継時的に測定した結果、併用群の腫瘍体積は、コントロール群、イミキモドおよびソラフェニブ単独群と比較して、有意に抑制されたことを確認した。

この併用療法はTKI単独使用時よりも抗腫瘍効果を高め、かつ副作用の少ない治療法として期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、イミキモド+TKI併用療法の有効性と安全性を示し、実臨床に応用できる新規併用療法として確立することである。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス腎癌同所移植モデルを用いたイミキモド+ソラフェニブ併用療法の抗腫瘍効果判定

マウス腎がん細胞 RENCA を BALB/c マウスの腎臓に同所移植し、コントロール、イミキモド皮膚塗布、ソラフェニブ経口投与、イミキモド+ソラフェニブ併用療法の各 4 群に分けて 28 日間連日治療を行い、腫瘍体積を測定した。

### (2) 免疫蛍光染色による腫瘍内 T リンパ

### 球浸潤の定量

RENCA 腫瘍をパラフィン包埋もしくは OCT 凍結包埋し、これら標本を FITC-Goat Anti-Hamster IgG(H+L) Mouse/Rat Ig Absorbed(1:100 希釈、CEDARLANE) 標識 Armenian hamster anti-mouse CD3- $\epsilon$  抗体(clone 145-2C11, 10  $\mu$ g/ml, ATCC)ならびに R-phycoerythrin-Texas red 標識 rat anti-mouse CD8- $\alpha$ /Lyt-2(clone 53-6.7, 5  $\mu$ g/ml, Southern Biotech Inc.)による免疫二重蛍光染色を行った。各治療群における腫瘍への陽性リンパ球数/mm<sup>2</sup>を計測し定量化した。

### (3) 腫瘍特異的細胞障害性 T 細胞活性(CTL)の測定

放射線照射処理をした  $1 \times 10^7$  個の RENCA 細胞を、1 回/週、計 3 回、BALB/c マウスの腹腔内に注射する。注射終了翌週に脾臓を摘出した。抽出した脾細胞を 5 日間培養した後に RENCA 細胞を加え、51Cr 遊離試験を行うことで、RENCA 細胞特異的な CTL 活性を測定した。イミキモドを添加することで、CTL 活性が上昇するかを検討した。

### (4) マウス腎癌モデルを用いたイミキモド+アキシチニブ併用療法の抗腫瘍効果判定

TKI+イミキモドの併用療法において至適 TKI を選別するため、TKI の一種であるアキシチニブを用いてイミキモドとの併用療法の抗腫瘍効果の評価を行った。RENCA 細胞をマウスの腎臓に同所移植し、i) Control(未治療)、ii) イミキモド経皮投与、iii) アキシチニブ経口投与、iv) イミキモド+アキシチニブ併用療法の 4 群に分け、28 日間連日治療を行った。

### (5) IFN- $\alpha$ とイミキモドの抗腫瘍効果と有害事象の比較

I 型インターフェロン(IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ )を活性化させる作用をもつイミキモドは IFN- $\alpha$  で代替できる可能性がある。そこでソラフェニブとの併用療法においてイミキモドあるいは IFN- $\alpha$  を併用し、それぞれの抗腫瘍効果と有害事象として体重の推移を検討した。RENCA 細胞を腎臓へ同所移植し、i) Control(未治療)、ii) ソラフェニブ+IFN- $\alpha$  皮下投与、iii) ソラフェニブ+イミキモドの 3 群に分け、28 日間連日治療を行った。

## 4. 研究成果

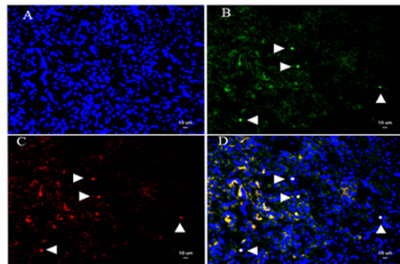
(1)腎同所移植モデルマウスにおいて、イミキモドとソラフェニブ併用療法は無治療コントロール、イミキモドおよびソラフェニブ単剤療法よりも有意な腫瘍抑制効果を示した。

表1. 腎同所移植モデルでの併用療法による腫瘍抑制効果

Therapy	Incidence	Tumor weight	
		Median (g)	Range (g)
Control	10/10	1.38	0.67-3.95
IQM	9/9	0.94	0.41-1.89
Sorafenib	9/9	1.23	0.48-1.72
Combination	10/10	0.48*	0.19-1.69

\*P<0.05 vs. control kidney tumor, as determined by the Mann-Whitney U test. IQM, imiquimod

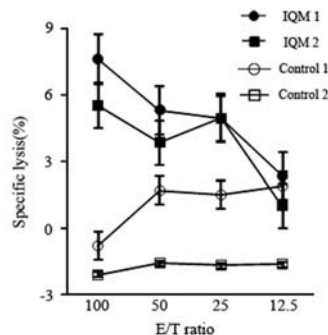
(2)



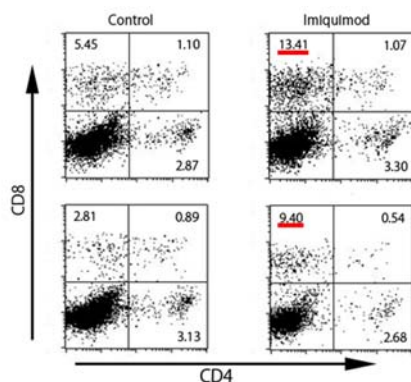
A, DAPI. B, FITC; CD3 ε+. C, Texas Red; CD8 α+. D, Marge

図から CD3 ε+ CD8 α+ T細胞の腫瘍内浸潤、すなわち CTL の腫瘍内浸潤を確認することが出来た。このことから併用療法により CTL が産生され、腫瘍内に浸潤したことが明らかとなった。

(3)



イミキモド投与により RENCA 細胞特異的な細胞障害活性が上昇し、CD4+ならびに CD8+ T 細胞のポピュレーションも増加した。



(4)

表2. アキシチニブとイミキモドの併用療法による腫瘍抑制効果

Therapy	Tumor weight		
	Average(g)	Median(g)	Range(g)
Control	2.346±0.298	2.77	1.61-2.94
IQM	2.084±0.347	2.29	0.75-2.79
Axitinib	2.405±0.468	2.77	1.03-3.05
Combination	1.962±0.482	1.24	1.14-3.29

いずれの治療群においても、無治療コントロール群と比較して腫瘍抑制効果を認めた。一方、併用療法による相加もしくは相乗効果は認められなかった。つまり、アキシチニブはイミキモドとの併用療法に適した TKI ではなかった。理由として、相乗効果のあったソラフェニブは raf 阻害活性を有しているため、直接の殺細胞効果を起こす。このことが、より抗腫瘍免疫環境に適していると考えられた。

(5) ソラフェニブに IFN-α あるいはイミキモドを併用しても腫瘍重量に差はみられなかったが、IFN-α を投与した場合には急な体重減少がみられた。このことから、ソラフェニブとの併用療法においてイミキモドは IFN-α と同等の腫瘍増殖抑制効果を持ち、IFN-α よりも生体に与える負担が少ないと考えられる。

(まとめ) 以上のことから、イミダゾキノリン誘導体であるイミキモドの経皮投与と、TKI、特にソラフェニブの経口投与は、腎癌に対する新規治療方法として有効であることが証明された。また、過去の免疫療法である IFN-α 療法と比較して、その有害事象は少ないことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Karashima T, Udaka K, Niimura M, Suzuki K, Osakabe H, Shimamoto T, Fukata S, Inoue K, Kuroda N, Seiki M, Shuin T. Therapy with transcutaneous administration of imiquimod combined with oral administration of sorafenib suppresses renal cell carcinoma growing in an orthotopic mouse model. *Oncology letters*. 2017; 14(1): 1162-1166. DOI: 10.3892/ol.2017.6235. 査読有

〔学会発表〕（計 3 件）

1. **辛島尚** マウス腎同所移植モデルを用いた腎癌に対するイミキモド経皮投与とソラフェニブ経口投与併用療法 2016.05.31-06.01, 第20回日本がん分子標的治療学会学術集会, 別府市
2. **辛島尚** 腎癌にたいするイミキモドとチロシンキナーゼ阻害剤の新規併用療法 2015.10.29-31, 第53回日本癌治療学会学術集会, 京都市
3. **辛島尚** 腎癌にたいするイミダゾキノリン誘導体とチロシンキナーゼ阻害剤の新規併用療法, 2015.04.18-04.21, 第103回日本泌尿器科学会, 金沢市

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：腎細胞がん治療剤  
発明者：辛島 尚, 執印 太郎  
権利者：国立大学法人高知大学  
種類：特許  
番号：特許願 2012-001595  
出願年月日：2012年1月6日  
国内外の別：日本

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

辛島 尚 (KARASHIMA, Takashi)  
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部  
門・准教授  
研究者番号：60304672

### (2) 研究分担者

執印 太郎 (SHUIN, Taro)  
高知大学・その他部局等・その他（教授相当）  
研究者番号：70128601

### (3) 連携研究者

黒田 直人 (KURODA, Naoto)  
高知大学・その他の部局等・客員教授  
研究者番号：60291457

### (4) 研究協力者 該当なし